

隕石・彗星内ハビタブルゾーンにおける大線量X線照射の影響評価に関する予察的研究

長沼 毅 (広大院生物圏)、伊村 智 (極地研)、岩月輝希 (JAEA)、川久保忠通 (KEK)、小林憲正 (横国大院工)、三枝誠行 (岡山大院自然)、佐藤 皓 (KEK)、嶋田和人 (JAXA)、白壁義久 (KEK)、高野淑識 (北大院理)、高山 健、俵 裕子 (KEK)、橋本博文 (筑大院シス情)、森田洋平 (KEK)、保田浩志 (放医研)、山下雅道 (JAXA)、吉田英一 (名大博物館)、金子竹男、谷内俊範、佐藤康之、小川智也、藪下さやか (横国大院工)、林 徹、許 玉福 (広大院生物圏)、中井亮佑 (広大生物生産)

Preliminary study on synchrotron X-ray irradiation against hypothetical intra-meteorite/-comet habitable zones

T. Naganuma*, S. Imura, T. Iwatsuki, T. Kawakubo, K. Kobayashi, M. Saigusa, H. Sato, K. Shimada, Y. Shirakabe, Y. Takano, K. Takayama, H. Tawara, H. Hashimoto, Y. Morita, H. Yasuda, M. Yamashita, H. Yoshida, T. Kaneko, T. Taniuchi, Y. Sato, T. Ogawa, S. Yabushita, T. Hayashi, N. P. Hua, R. Nakai

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-hiroshima, 739-8528 Japan. E-Mail: takn@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Microbial cells were irradiated with high-dose X-ray (0.2 nm, 500 R s⁻¹) for 0 to 5 min to examine their survivability based on the biological “energy currency”, *i.e.*, adenosine 5'-triphosphate (ATP), and the colony-forming units (CFU). The well-known radiation-resistant bacterium, *Deinococcus radiodurans*, and the normal and mini cells of *Escherichia coli* X-1488 were used for the irradiation tests. Minicells are known to lack genomic DNA, and were thus used to examine the effect of X-ray on non-DNA damages, while X-ray causes indirect (*e.g.*, via OH-radical formation) damages to DNA. The results were: 1) ATP showed highest survivability in the *D. radiodurans* cells, followed by the normal *E. coli* cells; 2) CFU of *D. radiodurans* showed highest survivability, too; and, 3) ATP and CFU of minicells showed rapid decrease despite absence of DNA to-be-damaged by X-ray irradiation. These results suggest that non-DNA damages (probably damages against proteins and/or membrane) affect the viability of minicells. Direct effects of X-ray irradiation against non-cellular ATP and other biomolecules should be assessed in future studies.

Key words: Habitable zone, meteorite, radiation, entry, impact, Panspermia

人類の月面ミッションや火星ミッションにおいて、無重力と並んで、あるいはそれ以上に問題になるのは放射線であろう。これは圏外生物学においても同様である。平成 18 年度 宇宙環境利用科学委員会 研究班「隕石・彗星内ハビタブルゾーン」Working Group (WG) では、宇宙における生物圏の広がりや「放射線からの遮蔽」および「放射線への耐性」という観点から理論的および実証的に考察している (長沼他 2005a, 2005b, 2006)。

宇宙環境放射線に関する生物学的調査として、これまで人体への影響評価や人体防護を目的とした医学的研究が多く行われてきた (Yatagai 2002; 藤高他 2004)。本 WG の研究は、これらの医学的研究と類似しつつも、圏外生物を含めた生物全般を対象とする点に特色がある。具体的には、地球

生物の中でも微生物の放射線耐性の特徴を従来の DNA 損傷研究などとは異なる観点から調査するための、研究計画の検討を行うものである。

たとえば、もし X 線など線エネルギー付与の低い放射線 (低 LET 放射線) による DNA 損傷の主な原因が H₂O 由来の OH ラジカルによる間接作用であるなら、乾燥した微生物ではそれが無い分、放射線耐性が向上したように見えるだろう。また、そもそも DNA のない細胞なら、放射線から DNA への直接作用もないと考えられる。

本研究の背景には「パンスペルミア仮説」の検証がある。パンスペルミア (panspermia; pan 汎、spermia 胚種) とは宇宙胚種とも呼ぶべき生命体であり、「宇宙にはパンスペルミアが漂い、地球など適当な惑星に降下してその惑星生命の起源と

なる」というパンスペルミア仮説が古くから提唱されている。パンスペルミアが宇宙を単体で漂っているのか、あるいは隕石や彗星などの「方舟」に保護されて飛来するのかが想像の域を出ない。いずれにせよ、宇宙放射線からの遮蔽・保護を考える上で、想像上のパンスペルミアではなく、現存する生物の放射線耐性の機作や限界を考えるのが本 WG の趣旨である。

本研究ではその最初の試みとして、宇宙放射線の大部分を占める粒子線ではなく、これまで比較的实验されていなかった大線量 X 線照射の影響を調べるために、放射線耐性微生物 *Deinococcus radiodurans* NBRC 15346 (Brooks et al. 1981) とゲノム DNA を欠いた大腸菌 *Escherichia coli* X-1488 ミニセル (Adler et al. 1967) を実験材料に用いて、その「生体エネルギー通貨」と呼ばれるアデノシン三リン酸(ATP)およびコロニー形成菌数(CFU)の残存を調べたので報告する。

材料と方法

照射試験に供した微生物は、放射線耐性微生物 *D. radiodurans* NBRC 15346、大腸菌 *E. coli* X-1488 および その DNA 欠損細胞であるミニセル (minicell) の 3 種類を用いた。*D. radiodurans* と *E. coli* は NBRC-802 培地と LB 培地でそれぞれ常法に従い培養し、さらに Jaffe et al. (1988) に従って *E. coli* ミニセルを調製した。この培養液から細胞を遠心分離 (14000 × g, 15 min) して集め、上澄みを捨てて ATP-free の 150 mM NaCl および 50 mM Tris-HCl に懸濁することをそれぞれ 2 回繰り返した (これを細胞の“洗浄”という)。最終的に細胞懸濁液 100 μl 当りの ATP 量および細胞数は Table 1 のようになった。ATP 量は実測し (下述)、細胞数は 3.5×10^5 cells per 1 pmol ATP (Kimura et al. 2003 の最小の cell-per-ATP 係数) から算出した。

Table 1. Initial ATP content and number of estimated microbial cells suspended in 100 μl applied to each irradiation target well.

per 100 μl	ATP (pmol)	cells (x 10 ⁶)
<i>D. radiodurans</i>	145	50
<i>E. coli</i>	21	7.4
<i>E. coli</i> minicell	9.3	3.3

細胞懸濁液各 100 μl をスライドグラス上に作成したターゲットウェル (3 mm、1 mm 深の凹部) に滴下して風乾し、照射試料とした。この滴下・風乾作業は照射直前に無菌的に行った。

風乾試料への放射線照射は高エネルギー加速器

研究機構 (KEK) の放射光施設 (PF) の BL-27B において行った。使用した放射光は波長 0.2 nm (6.2 keV) の X 線で、照射線量率は 500 R s^{-1} 、照射面は約 0.9 cm^2 (3 mm × 30 mm) であった。これを各試料 ($0.07 \text{ cm}^2 = 3 \text{ mm}$) に 0、0.5、1、2、3、4 および 5 分間照射した ($n = 2 \text{ or } 3$)。

照射後、試料を無菌的に回収し、広島大学にて残存 ATP と生残 CFU の定量を行った。まずターゲットウェルに 100 μl の緩衝液を滴下して風乾標品を再懸濁し、ATP 定量および CFU 計数に供した。ATP はルシフェリン - ルシフェラーゼ反応による発光を東亜 DKK 社製 AF-70 にて測定した。CFU は、0、0.5、1 および 2 分照射試料の再懸濁液を寒天平板に塗布して常法に従って培養し、形成されたコロニー数として計数した。

結果と考察

まず微生物懸濁液を調製した時の初期 ATP 含量 (Table 1) と照射 0 分の乾燥試料からの再懸濁液の ATP 量を比較すると、1/3 程度の減少が見られた。これは、広島大学で細胞懸濁液を調製してから KEK-PF で照射を行うまでの間に微生物の死、あるいは、微生物細胞内の ATP 消費による減少と考えられる。

X 線照射により、微生物 ATP は減少した。一般に ATP は生細胞 (生菌) 現存量の指標になるので、この ATP の減少は X 線照射による微生物の死滅を反映すると考えられる。これは *E. coli* 由来のミニセルにおいて顕著であった。ここで注意すべきは、供試細胞は乾燥状態にあったので液体の H₂O は存在せず、さらにミニセルは DNA を欠くので、X 線による間接的致死作用 (OH ラジカル生成による DNA 損傷) はあり得ないことである。つまり、DNA 損傷以外の X 線致死作用、たとえばタンパク質や細胞膜への損傷が致死的であり、それが DNA を持たないためにストレスに対して脆弱であると考えられるミニセルで顕著に現れたという可能性がある。

一方、*E. coli* および放射線耐性菌 *D. radiodurans* では ATP 減少が緩やかであった。*E. coli* と *D. radiodurans* で同様の傾向が見られたことから、これは *D. radiodurans* に特有の放射線耐性能 (DNA 修復能) に匹敵する「ATP 修復能」によるのではなく、*E. coli* と *D. radiodurans* に共通する理由があることを予想させる。たとえば、ATP が壊れにくい細胞内機作があるかもしれないこと、あるいは、そもそも ATP が X 線照射の影響を受けにくいという性質があるかもしれないことなどが考えら

れるが、その詳細は今後の研究を待たねばならない。今回はATPそのものに対するX線照射の影響を調べていないので、他の生体成分とも合わせて、今後の実験でデータを収集する予定である

ATPより直接的な生菌指標としてCFUがある。CFUもX線照射により減少した。ただし、DNAを欠くミニセルは増殖できないので、増殖を前提としたCFU計数もできない。*D. radiodurans*のCFU減少が緩やかなのは、この菌のストレス耐性能が単にDNA修復能だけでなく、細胞ないし細胞成分(核酸、タンパク質、細胞膜など)がX線に対して何らかの耐性を示す細胞機作を有するためであると考えられるが、その詳細は今後の研究課題である。

今回は大線量といえども低LETであるX線による照射実験を行ったが、今後は高LETである粒子線、特に全種イオン加速器(Takayama et al., 2007a, b)を用いた高エネルギー重粒子による照射実験も行い、放射線の種類による効果の違いも調べる予定である。

謝辞

本研究の照射実験は高エネルギー加速器研究機構(KEK)物質構造科学研究所放射光共同利用実験課題「ストレス耐性生物および生化学物質に及ぼす大線量放射光照射の影響に関する研究」(2006G411)により行った。

補記

波長(λ)0.2 nmの光子のエネルギーは 1×10^{-15} J (6.2 keV)であり、ウィーンの変位則 [λ (μm) = $2898 / K$]により約1450万Kの黒体放射に相当する。X線の「照射線量」の単位レントゲン(R)は $1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C kg}^{-1}$ である。空気の電離エネルギー(W値)34 eVをそのまま適用して「吸収線量」に変換すると $1 \text{ R} = 8.77 \text{ mGy} (\text{mJ kg}^{-1})$ になる。おそらく、本来ならば気体のW値ではなく、乾固した微生物細胞(固体)の電離エネルギー(ϵ 値; 一般にW値より小さい)を用いるべきであろうが、今回は考慮せずに話を進める。また、6 keVのX線に対する水、炭素(グラファイト)、酸素の質量エネルギー吸収係数はそれぞれ空気の1.06、0.46、1.19倍なので(Hubbell & Seltzer, 1996)大雑把に1倍として、本研究では照射線量1 R 吸収線量8.77 mJ kg^{-1} ($= 5.47 \times 10^{15} \text{ eV kg}^{-1}$)をそのまま用いることにする。

今実験の照射X線は $500 \text{ R s}^{-1} / 0.9 \text{ cm}^2$ だったので、ターゲットウェル面積(0.07 cm^2)当りでは約

39 R s^{-1} ということになる。このターゲットウェルに適下し風乾した微生物懸濁液100 μl 中の細胞数は 1.1×10^6 個 $\sim 100 \times 10^6$ 個である(Table 1)。細胞の断面積を $1 \mu\text{m}^2$ ($0.5 \times 2 \mu\text{m}$; $0.5 \mu\text{m}$ のミニセルは $0.2 \mu\text{m}^2$)とすると、その合計は 0.002 cm^2 (ミニセル)、 0.07 cm^2 (*E. coli*)、 1 cm^2 (*D. radiodurans*)となる。*D. radiodurans*の場合はターゲットウェル面積(0.07 cm^2)より値が大きいので、これは細胞が重なり合っていると想定し、ターゲットウェル面積をもって有効照射面積とする。*E. coli*の場合は細胞断面積の合計とターゲットウェル面積がほぼ一致したと考えられる。ミニセルの細胞断面積の合計へのX線照射率は 1 R s^{-1} 程度($500 \times 0.002 / 0.9$)だったと考えられる。

人間は 100 R h^{-1} 、5時間程度の照射で致命的らしい。自然放射線は $17 \sim 1100 \mu\text{R h}^{-1}$ である。人の一生で被曝する自然放射線の量は約20 R (200 mSv)である(寿命を75年とし、自然放射線の量を $30 \mu\text{R h}^{-1}$ として計算)。従来の放射線影響評価の研究では 1 R h^{-1} 程度の線量率が主に用いられていた。直接的な比較はできないが、今回用いたX線がいかに大線量であったかの参考までに示した。

文献

- Adler HI, Fisher WD, Cohen A, Hardigree AA (1967) Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **57**, 321-326.
- Brooks BW, Murray RGE (1981). Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. Int. J. Syst. Bacteriol., **31**, 353-360. 藤高和信・福田俊・保田浩志 (2004) 宇宙からヒトを眺めて - 宇宙放射線の人体への影響. 研成社.
- ホア NP・長沼 毅 (2005) 宇宙利用研究のモデル生物としての新規超ストレス耐性菌の可能性. Space Utiliz. Res., **21**, 274.
- Jaffe A, D'Ari R, Hiraga S (1988) Minicell-forming mutants of *Escherichia coli*: Production of minicells and anucleated rods. J. Bacteriol., **170**, 3094-3101.
- Kimura H, Asada R, Masta A, Naganuma T (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus Basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. Appl. Environ. Microbiol., **69**: 644-648.
- 長沼 毅・岩月輝希・小林憲正・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・俵 裕子・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2005a) 隕石・彗星内八ビ

- ダブルゾーン WG の目的と活動：「パンスペルミアの方舟」仮説の検証に向けて. *Space Utiliz. Res.*, **21**, 275-276.
- 長沼 毅・岩月輝希・小林憲正・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・俵 裕子・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2005b) 隕石・彗星内ハビダブルゾーン(パンスペルミアの方舟). *Biol. Sci. Space*, **19**, 8-24.
- 長沼 毅・伊村 智・岩月輝希・川久保忠通・小池惇平・小林憲正・三枝誠行・佐藤 皓・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・高山 健・俵 裕子・許 玉福・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2006) 隕石内ハビダブルゾーンにおける放射線・突入・衝突の影響評価に関する計画. *Space Utiliz. Res.*, **22**, 321-322.
- Hubbell JH, Seltzer SM (1996) Tables of X-Ray Mass Attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients. NIST Standard Reference Database 126.
<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>.
- Takayama K et al. (2007a) All-ion Accelerators: An Injector-free Synchrotron. *J. Appl. Physics*, in press.
- Takayama et al. (2007b) Experimental demonstration of the induction synchrotron. *J. Appl. Physics*, in press.
- Yatagai F (Supplement editor-in-chief) (2002) Space Radiation Research. *J. Rad. Res.* **43** Supplement, S1-S264.